



TITLE:

Live-cell FRET imaging reveals a role of extracellular signal-regulated kinase activity dynamics in thymocyte motility(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Konishi, Yoshinobu

CITATION:

Konishi, Yoshinobu. Live-cell FRET imaging reveals a role of extracellular signal-regulated kinase activity dynamics in thymocyte motility. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21641>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	小 西 義 延
論文題目	Live-cell FRET imaging reveals a role of extracellular signal-regulated kinase activity dynamics in thymocyte motility（FRET バイオセンサーを用いた胸腺細胞の生体イメージングが解明した、細胞外シグナル調節キナーゼによる運動動態制御）		
（論文内容の要旨）			
<p>【背景】 骨髄から移入したT細胞前駆細胞（胸腺細胞）は、胸腺内微小環境における細胞間相互作用を経て成熟し、T細胞へ分化する。胸腺細胞の運動制御は正常な細胞間相互作用確立と関係するため、その分子メカニズムを理解することは重要である。細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）は、T細胞受容体（TCR）により活性化され、T細胞の成熟と分化に必須の分子であることがわかっている。しかし、従来の技術では生体組織内を運動する単一細胞についてERK活性の経時変化を評価することが困難であったため、胸腺細胞の運動制御にERKがどのように関与するのかはわかっていなかった。そこで本研究では、胸腺細胞の運動制御分子メカニズム解明のために、胸腺細胞のERK活性と運動動態の関連を胸腺組織内で調べた。</p> <p>【方法】 胸腺組織内で細胞内ERK活性を可視化するために、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づくERKバイオセンサーを用い、これをT細胞特異的に発現するマウスを作製した（Lck-EKAREV-NLS）。このマウス由来の胸腺細胞を二光子励起顕微鏡下に観察し、胸腺組織内におけるERK活性と運動速度を調べた。</p> <p>【結果と考察】 ROSA26領域へERKバイオセンサー遺伝子を導入した新規レポーターマウスを作出し、T細胞特異的Creマウスと交配することで Lck-EKAREV-NLS マウスを得た。Lck-EKAREV-NLSマウスを評価するために、抗CD3抗体を投与しTCR刺激を加え、FRET効率の上昇を確認した。また、阻害剤投与によりFRET効率の低下が認められた。これらの結果からLck-EKREV-NLSマウスはT細胞ERK活性を可視化できることが確認された。次に胸腺のFRETイメージングを行い、胸腺細胞のERK活性は細胞毎に多様性を持つことを明らかにした。更に、サブセット間でERK活性が異なるか検討するために、CD4CD8ダブルポジティブ（DP）、CD4/CD8シングルポジティブ（CD4-SP、CD8-SP）に分類しERK活性を比較した。DPはSPに比べてERK活性が高く、分化段階に応じてERK活性が低下することが示唆された。</p> <p>ERK活性と運動速度の関連を調べるため経時観察を行い、胸腺細胞のERK活性は運動速度と負の相関関係にあることを見出した。この結果は阻害剤処理でも確認でき、胸腺細胞のERK活性化が運動抑制に作用していると示された。</p> <p>単一細胞レベルにおいて ERK 活性化が運動速度を抑制するか評価するために、細胞毎に ERK 活性と運動速度との相関を調べた。また、それぞれの平均値からの偏差を算出しその相関</p>			

<p>も調べた。その結果、DPおよびCD8-SPではERK活性と運動速度との間に、一方CD4-SPでは偏差間に負の相関関係が認められた。ERK活性化による運動抑制様式がサブセット間で異なるものと考えられた。</p> <p>CD4-SPのERK活性に偏差をもたらす因子を解明するため、MHCクラスII分子を欠損した胸腺組織内でERK活性および運動速度を調べた。その結果、ERK活性変動の低下および運動速度の上昇が認められた。従ってCD4-SPはTCRとMHCクラスII分子を介した細胞間相互作用によるERK活性化に応じて運動速度が抑制されると示唆された。</p> <p>【結論】 胸腺細胞の運動が ERK 活性化により抑制されること、ならびにその抑制様式がサブセット間で異なることを明らかにした。FRET イメージングにより生理的条件下での解析が可能になると考えられ、T細胞運動制御研究における本手法の有用性が示された。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>ERK マップキナーゼは細胞膜の情報を感知し、細胞の増殖、分化、運動などを制御する。胸腺細胞の分化成熟に、適切な運動制御および ERK 活性がそれぞれ必須であることが知られていた。しかし、これまで組織内の単一細胞について ERK 活性の経時変化の評価は困難であったため、胸腺細胞の運動制御に ERK 活性が関与するのかどうか不明であった。この問題を克服するために、申請者は ERK 活性を経時的に可視化できる FRET バイオセンサーの発現ユニットを ROSA26 遺伝子座へ導入した新規マウスを作出した。その結果、従来は観察困難であった組織胸腺細胞の FRET イメージングが可能となった。この技術により、組織から単離した胸腺細胞を用いては観察できない、DP細胞と CD4-SP あるいは CD8-SP 細胞間の ERK 活性の差を発見した。更に、ERK 活性が胸腺細胞の運動を抑制すること、その抑制様式がサブセット間で異なることを見出した。特に CD4-SP 細胞では TCR と MHC クラス II 分子を介した細胞間相互作用が ERK 活性に動的变化を生み、結果として細胞運動を抑制することを明らかにした。ERK 活性化による運動抑制が TCR を介した抗原認識に貢献し、正常な T 細胞の産生へ寄与することが示唆された。</p> <p>以上の研究は、胸腺細胞の運動制御に関する ERK 活性動態の機能解明に貢献し、胸腺細胞の運動制御分子メカニズムの理解に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			